



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 111944043 A

(43) 申请公布日 2020.11.17

(21) 申请号 202010901809.7

C07K 1/18 (2006.01)

(22) 申请日 2020.09.01

C07K 1/14 (2006.01)

(71) 申请人 华兰生物工程重庆有限公司

地址 408000 重庆市涪陵区鹤凤大道66号

申请人 华兰基因工程有限公司

华兰生物工程股份有限公司

(72) 发明人 夏琦鸿 刘余江 龚行 滕世超

张宝献 张建瑾

(74) 专利代理机构 重庆中之信知识产权代理事

务所(普通合伙) 50213

代理人 罗庆

(51) Int. Cl.

C07K 16/06 (2006.01)

C07K 1/36 (2006.01)

C07K 1/34 (2006.01)

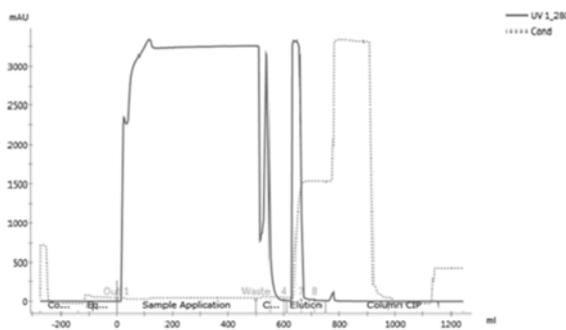
权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54) 发明名称

一种从血浆废弃物中提取IgM的方法

(57) 摘要

本发明提供了一种从血浆废弃物中提取IgM的方法,其包括步骤:S1将FIII沉淀用缓冲液倍数稀释至溶解,然后经过滤后待用,其中缓冲液pH为3.7~4.3;S2调节S1中所得物的pH至4.0~5.0;S3向S2中所得物添加正辛酸,22~28℃搅拌2h,然后进行降温搅拌2h直至温度降至5℃,其中正辛酸的添加量为1.0%~2.0%(w/v);S4将S3中所得物离心或过滤,收集上清液或过滤液;S5将S4中所得物进行超滤以截留分子量为50000~100000的蛋白分子;S6将S5中所得物调节pH至4.5~5.5、调节电导1.0~2.0mS/cm;S7将S6中所得物用TMAE阴离子交换层析,收集流穿液,得到的流穿液即为富含IgM的流穿液。本发明最终能够使得预防和治疗细菌感染的药物制剂的生产成本得以降低,同时避免了血浆废弃物的丢弃。



1. 一种从血浆废弃物沉淀中提取IgM的方法,其特征在于,包括以下步骤:  
S1将FIII沉淀用缓冲液溶解,然后经过滤、并收集过滤液待用,其中缓冲液pH为3.7~4.3;  
S2调节S1中所得物的pH至4.0~5.0;  
S3向S2中所得物添加正辛酸,22~28℃搅拌2h,然后进行降温搅拌2h直至温度降至5℃,其中正辛酸的添加量为1.0%~2.0% (w/v);  
S4将S3中所得物离心或过滤,收集上清液或过滤液;  
S5将S4中所得物进行超滤;  
S6将S5中所得物调节pH至4.5~5.5、调节电导1.0~2.0mS/cm;  
S7将S6中所得物用TMAE阴离子交换层析,收集流穿液,得到的流穿液即为富含IgM的流穿液。
2. 如权利要求1所述的一种从血浆废弃物中提取IgM的方法,其特征在于,所述S1中FIII沉淀溶解温度为22~28℃,时间为4h;所述缓冲液为0.05M醋酸-醋酸钠。
3. 如权利要求1所述的一种从血浆废弃物中提取IgM的方法,其特征在于,S2中,pH调节剂为0.5mol/L的氢氧化钠溶液。
4. 如权利要求1所述的一种从血浆废弃物中提取IgM的方法,其特征在于,S4中,离心调节为4000转处理20分钟。
5. 如权利要求1所述的一种从血浆废弃物中提取IgM的方法,其特征在于,S4中,过滤采用0.2μm的滤材直接过滤。
6. 如权利要求5所述的一种从血浆废弃物中提取IgM的方法,其特征在于,过滤时向S3中所得物中加入1.0% (w/v) 硅藻土。
7. 如权利要求1所述的一种从血浆废弃物中提取IgM的方法,其特征在于,S5中,截留后所得物的电导小于0.5mS/cm、蛋白含量10~30g/L。
8. 如权利要求1所述的一种从血浆废弃物中提取IgM的方法,其特征在于,S6中pH调节剂为0.5mol/L的氢氧化钠溶液或0.5mol/L的醋酸钠溶液、电导调节剂为0.5mol/L的氯化钠溶液。
9. 如权利要求1所述的一种从血浆废弃物中提取IgM的方法,其特征在于,S2中pH为4.4~4.6。
10. 如权利要求1所述的一种从血浆废弃物中提取IgM的方法,其特征在于,S3中,正辛酸添加量为1.0%~1.5% (w/v)。

## 一种从血浆废弃物中提取IgM的方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及蛋白质提取技术领域,尤其涉及一种从血浆废弃物中提取IgM的方法。

### 背景技术

[0002] 人免疫球蛋白M(IgM)免疫球蛋白由重链和轻链组成,根据重链(Heavychain,H链)恒定区化学结构的不同,相应的免疫球蛋白被划分为多种类型,分别为免疫球蛋白M(IgM)、免疫球蛋白D(IgD)、免疫球蛋白A(IgA)、免疫球蛋白E(IgE)、免疫球蛋白G(IgG)。

[0003] IgM占血清Ig总量的6%,主要由脾脏中浆细胞合成,是机体受抗原刺激后最先产生的抗体,起“先锋免疫”作用,具有很强的细胞毒活性和细胞溶解活性。一个IgM分子由5个单体通过J链连接成五聚体,有较高抗原结合价,也是五类免疫球蛋白(IgA、IGD、IGE、IgG、IgM)中分子量最大的,其分子量为950K道尔顿,故又称为巨球蛋白。IgM对防止菌血症起主要作用,作为血浆中两种主要抗体之一,IgM在抗体介导的体液免疫应答中比IgG所起的作用更强,具体表现在极强的抗原中和作用、免疫调理作用,其杀菌、溶菌、促吞噬及凝集作用比IgG强500~1000倍。IgM是高效抗微生物抗体,制备富含IgM的Ig制剂可提供一种理想的预防和治疗细菌感染的药物,并可使血浆得到更有效的利用。

[0004] 然而目前市售的富含IgM的Ig制剂中IgM含量较低,只有10%左右,IgM在抗细菌感染治疗中的优势不能真正体现,从而限制了其在临床上的广泛应用。目前含有IgM的制剂并不适合于一开始就采用该药物,主要原因是用于治疗血液细菌感染的IgM相当昂贵。

[0005] 因此,研究科学有效的生产工艺,以提高制剂中IgM的纯度,增强制剂的效力,并尽可能降低生产成本,是非常有必要的。

### 发明内容

[0006] 针对现有技术中所存在的不足,发明提供了一种从FIII沉淀中回收IgM的方法,该方法是从废弃的FIII沉淀中回收IgM,通过低pH条件下用正辛酸将大量杂蛋白进行沉淀,通过加入硅藻土增加蛋白溶液的过滤量,再通过一步阴离子交换层析进一步降低IgA的含量。

[0007] 根据发明的实施例,一种从血浆废弃物中提取IgM的方法,其包括以下步骤:

[0008] (1) FIII沉淀溶解于12倍缓冲液中,22~28℃、4h,采用终端为小于或等于0.6μm的滤材进行过滤,缓冲液为0.05M醋酸-醋酸钠,pH3.7~4.3;

[0009] (2) 将步骤(1)得到的上清液用0.5mol/L的氢氧化钠溶液调节pH 4.0~5.0,并准确量取体积;

[0010] 进一步限定,步骤(2)中pH为4.4~4.6;

[0011] (3) 根据步骤(2)测量的体积,按照1.0%~2.0% (w/v) 计算正辛酸加量,并加入至步骤(2)蛋白溶液中,边加入边搅拌,22~28℃搅拌2h、降温搅拌2h最终温度至5℃;

[0012] 进一步限定,步骤(3)中正辛酸加量为1.0%~1.5% (w/v);

[0013] (4) 将步骤(3)中的蛋白溶液采用离心或过滤得到上清液,离心条件4000转处理20分钟,再用终端为小于或等于0.2μm的滤材过滤或蛋白溶液中加入1.0% (w/v) 硅藻土进行

压滤；

[0014] (5) 将步骤(4)得到的蛋白溶液截留分子量50000~100000的超滤机进行超滤透析至电导小于0.5mS/cm,蛋白含量10~30g/L;

[0015] 进一步限定,步骤(5)中蛋白含量为13~17g/L;

[0016] (6) 将步骤(5)得到的蛋白溶液用0.5mol/L的氢氧化钠溶液或0.5mol/L的醋酸钠溶液调节pH4.5~5.5,用0.5mol/L的氯化钠溶液调节电导1.0~2.0mS/cm;

[0017] (7) 将步骤(6)得到的蛋白溶液用TMAE阴离子交换层析,收集流穿液,得到的流穿液即为富含IgM的流穿液。

[0018] 相比于现有技术,本发明具有如下有益效果:

[0019] 从血浆废弃物FIII沉淀中提取富含IgM的流穿液,提高流穿液中IgM的含量,最终能够使得预防和治疗细菌感染的药物制剂的生产成本得以降低,同时避免了血浆废弃物的丢弃;

[0020] 所得的流穿液中IgA的含量得以进一步降低,能够提高预防和治疗细菌感染的药物制剂的安全性。

## 附图说明

[0021] 图1:为本发明实施例的层析图谱。

## 具体实施方式

[0022] 下面结合实施例对本发明中的技术方案进一步说明。

[0023] 实施例1

[0024] 实验步骤:

[0025] (1) 取0.417kgFIII沉淀于5L蓝盖瓶中,加入0.05M、pH3.7醋酸-醋酸钠缓冲液定容至5L于25℃搅拌溶解4h,使用60LP滤堆进行过滤;

[0026] (2) 上清液用0.5mol/L的氢氧化钠溶液调节pH4.5,并准确量取体积;

[0027] (3) 蛋白溶液加入正辛酸(1.5%w/v),边加入边搅拌,于22~24.6℃搅拌2h,再持续搅拌2h并用冰水混合物降温至最终温度5℃以下;

[0028] (4) 取蛋白溶液300ml,共计10份,按照0%、0.1%、0.3%、0.5%、1.0%分别添加硅藻土各两份,其中一半直接使用润湿的50sp滤板过滤,另一半使用平衡液润湿滤板过滤,平衡液为0.05M醋酸-醋酸钠缓冲液pH4.5、0.1%硅藻土;

[0029] (5) 在冰水混合物中持续搅拌0.5h,用50sp滤板进行过滤,用量筒准确量取过滤后蛋白溶液体积。

[0030] 试验结果如下表1:

[0031] 表1

[0032]

硅藻土加量(g/ml)	0	0.1%	0.3%	0.5%	1.0%
无平衡液润洗过滤量(ml)	40	47	54	65	129
有平衡液润洗过滤量(ml)	42	49	58	73	130

[0033] 实验结论:

[0034] 由上表1可以看出,有平衡液润洗的滤板的过滤量稍微高于没有用平衡液滤板润

洗的过滤量；加入1.0%含量的硅藻土的蛋白制品的过滤量是未加入硅藻土的蛋白制品的过滤量的三倍多，很大程度上提高了50sp过滤的过滤能力。

[0035] 实施例2

[0036] 实验步骤：

[0037] (1) 取0.417kgFIII沉淀于5L蓝盖瓶中，加入0.05M、pH4.0醋酸-醋酸钠缓冲液定容至5L于25℃搅拌溶解4h，使用60LP滤堆进行过滤；

[0038] (2) 上清液用0.5mol/L的氢氧化钠溶液调节pH4.5，并准确量取体积；

[0039] (3) 蛋白溶液加入正辛酸(1.5%w/v)，边加入边搅拌，于25.3~28℃搅拌2h，再持续搅拌2h并用冰水混合物降温至最终温度5℃以下；

[0040] (4) 将蛋白制品平均分为两份，其中一份加入1.0%硅藻土，于冰水混合物中搅拌0.5h，另一份在冰水混合物中继续搅拌0.5h；

[0041] (5) 分别过滤上清液，用截留分子量为50000的超滤机浓缩，最终体积均为97ml。

[0042] 试验结果如下表2：

[0043] 表2

[0044]

	IgA (g/L)	IgM (g/L)	IgG (g/L)
未加入硅藻土	0.63	2.55	6.60
加入1.0%硅藻土	0.63	2.61	6.84

[0045] 实验结论：

[0046] 由上表2可以看出，三种Ig类蛋白在有无硅藻土情况下没有明显的差异，说明硅藻土的添加不影响蛋白的收率。

[0047] 实施例3

[0048] 实验步骤：

[0049] (1) 取0.417kgFIII沉淀共四份分别于5L蓝盖瓶中，分别加入0.05M、pH4.3醋酸-醋酸钠缓冲液定容至5L于25℃搅拌溶解4h，使用60LP滤堆进行过滤；

[0050] (2) 上清液用0.5mol/L的氢氧化钠溶液调节pH4.5；

[0051] (3) 按照体积的1.0%、1.5%、2.0%、2.5%，分别计算并加入正辛酸，边加入边搅拌，控制温度23~28℃搅拌2h，再持续搅拌2h同时用冰水混合物降温至最终温度5℃以下；

[0052] (4) 分别过滤上清液，用截留分子量为50000的超滤机浓缩，并测量顶机后的体积，检测IgA、IgM、IgG、总蛋白含量。

[0053] 试验结果如下表3：

[0054] 表3

[0055]

正辛酸加量	超滤后制品体积 ( ml )	蛋白含量 ( g/L )	IgA ( g/L )	IgM ( g/L )	IgG ( g/L )
1.0%	48	63.6	5.14	18.76	42.56
1.5%	44	49.4	4.16	13.63	34.22

[0056]	2.0%	46	37.0	3.29	9.29	25.70
	2.5%	49	34.0	2.98	8.32	23.78

[0057] 实验结论:

[0058] 由上表3可知,在蛋白含量一定的时候蛋白制品中IgA、IgM、IgG含量相差得不多。但随着正辛酸含量的增加,IgM、IgG、总蛋白均明显的降低,说明正辛酸的加量对蛋白制品里的蛋白含量有很明显的影响,其中加量为1.0%时相同沉淀下IgM与IgG的收率最高。

[0059] 实施例4

[0060] 实验步骤:

[0061] (1) 取0.417kgFIII沉淀与5L蓝盖瓶中,加入0.05M、pH4.0醋酸-醋酸钠缓冲液定容至5L于25℃搅拌溶解4h,使用60LP滤堆进行过滤;

[0062] (2) 上清液用0.5mol/L的氢氧化钠溶液调节pH至4.5,并准确量取体积4.72L;

[0063] (3) 蛋白溶液加入正辛酸70.8g,边加入边搅拌,于24.7~25.3℃搅拌2h,再持续搅拌2h并用冰水混合物降温至最终温度5℃;

[0064] (4) 蛋白溶液趁冷离心(4000r/min、20min),上清液采用截留分子量50000的超滤机进行超滤浓缩至电导小于0.5mS/cm,蛋白含量20g/L;

[0065] (5) 用0.5mol/L的氢氧化钠溶液或0.5mol/L的醋酸钠溶液调节将浓缩液调节pH至5.0,用0.5mol/L的氯化钠溶液调节电导1.5mS/cm,用TMAE进行离子交换层析,收集流穿液;

[0066] (6) 配制,将流穿液用截留分子量为50000的超滤机浓缩,并用8倍水透析,最终浓缩至蛋白含量为50g/L,浓缩物中加入麦芽糖使浓度为10%,调节pH为4.0,除菌过滤。

[0067] 试验结果如下表4:

[0068] 表4

[0069]	IgA (g)	IgM (g)	IgG (g)	IgA占Ig (A+M+G) 的比例 (%)
层析前	0.55	2.62	5.6	6.27
流穿液	0.20	2.67	5.4	2.42

[0070] 实施例5

[0071] 除以下内容外,与实施例4一致,具体不同在于:

[0072] (2) 中,上清液用0.5mol/L的氢氧化钠溶液调节pH至4.4;

[0073] (3) 中,正辛酸添加量为47.2g;

[0074] (4) 中,上清液采用截留分子量100000的超滤机进行超滤浓缩至电导小于0.5mS/cm,蛋白含量为10g/L;

[0075] (5) 中,蛋白溶液用0.5mol/L的氢氧化钠溶液或0.5mol/L的醋酸钠溶液调节pH至4.5;用0.5mol/L的氯化钠溶液调节电导1.0mS/cm;

[0076] (6) 中,10倍水透析,最终浓缩至蛋白含量为60g/L,浓缩物中加入麦芽糖使浓度为15%,调节pH为4.2,除菌过滤。

[0077] 试验结果如下表5:

[0078] 表5

[0079]	IgA (g)	IgM (g)	IgG (g)	IgA占Ig (A+M+G) 的比例 (%)

层析前	0.60	2.70	5.7	6.67
流穿液	0.21	2.71	5.6	2.46

[0080] 实施例6

[0081] 除以下内容外,与实施例4一致,具体不同在于:

[0082] (2)中,上清液用0.5mol/L的氢氧化钠溶液调节pH至4.6;

[0083] (3)中,正辛酸添加量为94.4g;

[0084] (4)中,上清液采用截留分子量80000的超滤机进行超滤浓缩至电导小于0.5mS/cm,蛋白含量为30g/L;

[0085] (5)中,蛋白溶液用0.5mol/L的氢氧化钠溶液或0.5mol/L的醋酸钠溶液调节pH4.5~5.5;用0.5mol/L的氯化钠溶液调节电导2.0mS/cm;

[0086] (6)中,5倍水透析,最终浓缩至蛋白含量为30g/L,浓缩物中加入麦芽糖使浓度为8%,调节pH为3.8,除菌过滤。

[0087] 试验结果如下表6:

[0088] 表6

	IgA (g)	IgM (g)	IgG (g)	IgA占Ig (A+M+G) 的比例 (%)
层析前	0.49	2.58	5.2	5.93
流穿液	0.18	2.60	5.0	2.31

[0090] 上述实施例4~6中:

[0091] 由上表4、5、6可以看出,本发明制备的富含IgM的IgG中,IgA的含量由层析前的5.93~6.67%降低为流穿液的2.31~2.46%,通过一步离子交换层析将IgA的含量降得非常低,提高了成品的安全性。上述实施例中的FIII沉淀,即cohn低温乙醇法生产过程中废弃组分III沉淀。

[0092] 最后说明的是,以上实施例仅用以说明本发明的技术方案而非限制,尽管参照较佳实施例对本发明进行了详细说明,本领域的普通技术人员应当理解,可以对本发明的技术方案进行修改或者等同替换,而不脱离本发明技术方案的宗旨和范围,其均应涵盖在本发明的权利要求范围当中。

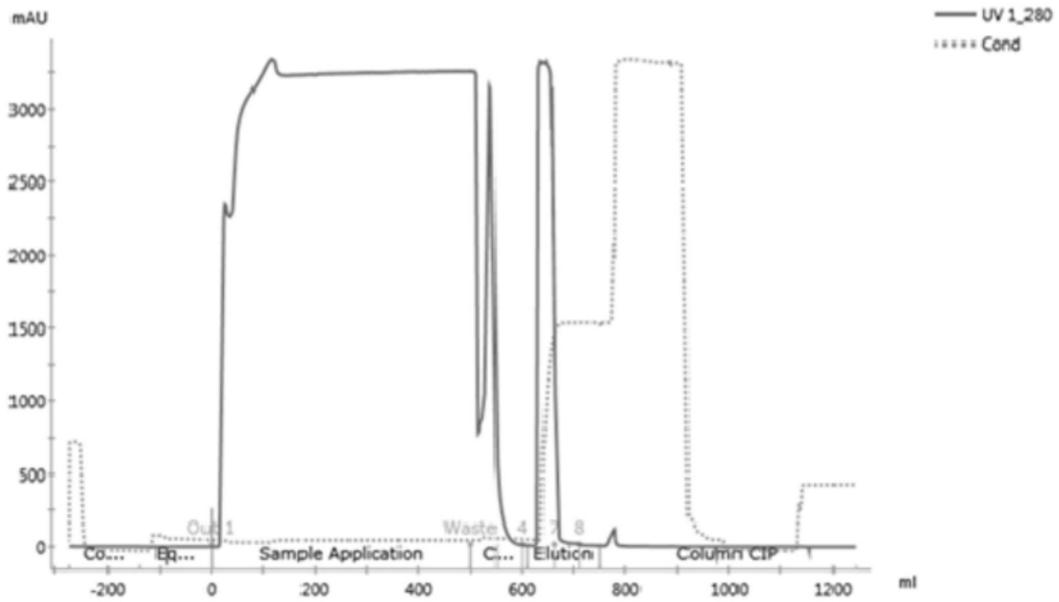


图1